

SIMULTANEOUS EXPRESSION OF TWO KINDS OF INSECTICIDAL PROTEINS

Publication number: JP1104177 (A)

Publication date: 1989-04-21

Inventor(s): OITA KENJI; NISHIOKA RIKA; OSHIE KAZUYUKI; SHIMIZU MASATOSHI; NAKAMURA KEIKO; TAKADA YASUSHI; MIKITANI KENICHI; OKAWA HIDEO

Applicant(s): SUMITOMO CHEMICAL CO

Classification:

- **international:** C12N15/09; C07K14/325; C12N1/20; C12N15/00; C12P21/02; C12R1/07; C12R1/19; C12N15/09; C07K14/195; C12N1/20; C12N15/00; C12P21/02; (IPC1-7): C12N1/20; C12N15/00; C12P21/02

- **European:** C07K14/325

Application number: JP19870319288 19871216

Priority number(s): JP19870319288 19871216; JP19870171913 19870708

Abstract of JP 1104177 (A)

PURPOSE: To produce two kinds of insecticidal proteins in large quantities at the same time, by forming a gene containing structural genes coding two kinds of insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis aizawai* IPL strain connected in series in the same direction. **CONSTITUTION:** A manifestation plasmid containing a gene composed of structural genes coding two kinds of proteins of *Bacillus thuringiensis aizawai* IPL strain having prescribed amino acid sequence, wherein said genes are connected in series in the same direction. The manifestation plasmid can manifest said gene in a microbial cell. A microorganism transformed with the manifestation plasmid and capable of producing insecticidal proteins is cultured to obtain the objective insecticidal proteins.; The insecticidal protein gene to be used in the above process is preferably 130KDa insecticidal protein gene exhibiting strong insecticidal activity against diamondback moth and common cutworm.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

⑫ 公開特許公報 (A) 平1-104177

⑬ Int. Cl. 4 C 12 N 15/00 1/20 C 12 P 21/02	識別記号 A-8412-4B 8515-4B C-6712-4B	⑭ 公開 平成1年(1989)4月21日 ※審査請求 未請求 発明の数 3 (全20頁)
------------------------------------------------------	-------------------------------------------	-------------------------------------------------

⑮ 発明の名称 2種の殺虫蛋白の同時発現

⑯ 特願 昭62-319288

⑰ 出願 昭62(1987)12月16日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)7月8日 ⑲ 日本 (JP) ⑳ 特願 昭62-171913

㉑ 発明者 大江田 憲治 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内

㉑ 発明者 西岡 里佳 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内

㉑ 発明者 押柄 和幸 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内

㉒ 出願人 住友化学工業株式会社

㉓ 代理人 弁理士 諸石 光熙 外1名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

2種の殺虫蛋白の同時発現

2. 特許請求の範囲

(1) 第1図及び第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミド

(2) 第1図記載の塩基配列(塩基番号1～3465)及び第2図に記載の塩基配列(塩基番号1～3528)で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の発現プラスミド

(3) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子

の各々の5'及び3'末端側にそれぞれ lacプロモーターおよびrrnBターミネーターを保持する遺伝子カートリッジを直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させることを特徴とする特許請求の範囲第1項および第2項記載の発現プラスミド。

(4) 発現プラスミドpEBCB1で特定される特許請求の範囲第1項記載の発現プラスミド

(5) 発現プラスミドpTBKG5で特定される特許請求の範囲第3項記載の発現プラスミド

(6) 第1図及び第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物

(7) 第1図記載の塩基配列(塩基番号1～3465)及び第2図に記載の塩基配列(塩基番号1～3528)で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白をコードす

る構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産することを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の微生物

(8) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子の各々の5'及び3'末端側にそれぞれ lacプロモーターおよびrrnBターミネーターを保持する遺伝子カートリッジを直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産することを特徴とする特許請求の範囲第6項および第7項記載の微生物。

(9) 発現プラスミドpKCB1を保持する特許請求の範囲第6項記載の微生物

(10) 発現プラスミドpTBKCSを保持する特許請求の範囲第8項記載の微生物。

(11) 第1図及び第2図に記載のアミノ酸配列で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝

子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法

(12) 遺伝子が第1図記載の塩基配列(塩基番号1～3465)及び第2図に記載の塩基配列(塩基番号1～3528)で特定されるバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第11項記載の殺虫蛋白の製造方法

(13) バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の2種の殺虫蛋白をコードする構造遺伝子の各々の5'及び3'末端側にそれぞれ lacプロモーター及びrrnBターミネーターを保持する遺伝子カートリッジを直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを微生物菌体内で発現させる発現プラスミドにより形質転換され殺虫蛋白を生産する微生物

を培養することを特徴とする特許請求の範囲第11項および第12項記載の殺虫蛋白の製造方法。

(14) 発現プラスミドpKCB1を保持する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第11項記載の製造方法

(15) 発現プラスミドpTBKCSを保持する微生物を培養することを特徴とする特許請求の範囲第13項記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の2種の殺虫蛋白遺伝子を含みこれを宿主内で同時に発現させる発現プラスミド、該プラスミドを保持しバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の殺虫蛋白を生産する微生物および該微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法に関する。

さらに詳しくは、本発明は、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の2種の殺虫蛋白遺伝子のうち特に網翅目昆蟲であるコナガ、ハスモ

シヨトウに対し強い殺虫活性を示す第1図記載のアミノ酸配列で特定される殺虫蛋白および特にカイコに対し強い殺虫活性を示す第2図に記載のアミノ酸配列で特定される殺虫蛋白をコードする遺伝子を直列に同方向に接続した遺伝子を含みこれを宿主内で発現させる発現プラスミド、該プラスミドを保持しバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ・IPL株の殺虫蛋白を生産する微生物および該微生物を培養することを特徴とする殺虫蛋白の製造方法に関する。

従来技術

バチラス・チュリンゲンシスの各種菌株は、胞子形成期に殺虫蛋白からなる1～2μmに及ぶ結晶を形成し、この結晶蛋白を摂食した網翅目害虫は、摂食活動を停止し、腸管破裂等ののち、死に至ることが知られている。バチラス・チュリンゲンシス株は、鞭毛抗原やエステラーゼ活性などにより29亞種に分類されており、各々の菌株は特異的、かつそれぞれ異なる殺虫活性を示す。各種菌株の中から防除目的の害虫に対して最も有効な菌

株を選定し、それを培養することによって菌体内に殺虫蛋白を作らせ、殺虫蛋白、脂子及び菌体残渣を含む懸濁液にタルク等を混合することにより製剤を調製し、それを殺虫剤として用いる。

問題解決の手段

本発明者は、遺伝子工学的手法を用いて殺虫スペクトルの広いバチラス・チュリンゲンシス殺虫蛋白型剤を生産することを目的とし、公知の菌バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の保持する2種の異なる殺虫活性を有する殺虫蛋白遺伝子について研究を重ねた結果、特にコナガ、ハスモンヨトウに対し強い殺虫活性を示す130kDaの殺虫蛋白（以下130kDa殺虫蛋白と呼ぶ）及びカイコに対し強い殺虫活性を示す135kDaの殺虫蛋白（以下135kDa殺虫蛋白と呼ぶ）の両殺虫蛋白遺伝子を微生物菌体内で同時に発現させる発現用プラスミド及び該プラスミドを保持し両殺虫蛋白を生産する微生物を創製し、この微生物を培養することにより、異なる殺虫活性を有する2つの殺虫蛋白を同時に、大量生産する製造方法を完成した。

本発明に用いる殺虫蛋白遺伝子は特にコナガ、ハスモンヨトウに対し強い殺虫活性を示す130kDa殺虫蛋白遺伝子（特開昭62-100292）及びカイコに対し強い殺虫活性を示す135kDa殺虫蛋白遺伝子（特願昭61-193483）である。本発明の2種の殺虫蛋白同時発現用プラスミドは、プロモーター及びターミネーターを保持する一方の殺虫蛋白遺伝子カートリッジの構造遺伝子の上流または下流に他の殺虫蛋白遺伝子を直列に同方向に挿入し、接続することにより製造することができる。ここで挿入する方の殺虫蛋白遺伝子は殺虫蛋白構造遺伝子のみの場合、上流にプロモーターおよびSD領域を有する遺伝子の場合あるいは上流にSD領域を有する遺伝子の場合のいずれでもよい。さらに、2種の殺虫蛋白につき、各々プロモーター及びターミネーターを保持する殺虫蛋白遺伝子カートリッジを製造し、カートリッジとカートリッジを直列に同方向に接続することによっても製造できる。この例として、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の135kDa殺虫

蛋白遺伝子カートリッジを含む発現プラスミドpKC6 (ATCC 67487) に130kDa殺虫蛋白遺伝子を同方向に挿入し接続することにより得られた2種殺虫蛋白同時発現プラスミドpKC81を挙げることができる。

また、構造遺伝子の前後にプロモーター及びターミネーターを保持する2種の殺虫蛋白遺伝子カートリッジの接続による2種の殺虫蛋白同時発現用プラスミドの例として、発現プラスミドpTB1（特開昭62-181784に従い、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL No.7 株(PBBM BP-1150)より構築できる）由来の130kDa殺虫蛋白遺伝子カートリッジと発現プラスミドpKC6(ATCC 67487)由来の135kDa殺虫蛋白遺伝子カートリッジの接続により得られた発現プラスミドpTBKC5を挙げることができる。

接技術を用い同一の殺虫蛋白遺伝子を直列に接続し、プラスミド上の殺虫蛋白遺伝子のコピー数を倍化することができ、このことにより殺虫蛋白の生産を増大させることも可能である。

遺伝子組換え技術によれば基本となるDNAの特定の部位に、該DNAがコードする蛋白の基本的な特性を変化させることなく、あるいは改善するよう、人為的に変異をおこすことができる。本発明により提供される、天然の塩基配列を有する遺伝子DNAあるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子DNAに関しても同様に人為的に塩基の欠失、付加、置換などを行うことにより天然の遺伝子と同等あるいは改善された特性とすることが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子をも含むものである。

本発明のバチラス・チュリンゲンシスの直列に接続された2種の殺虫蛋白遺伝子の発現のプロモーターおよびターミネーターとしては、発現ベクターpUC18(ファルマシア社)のlacプロモーター、発現ベクターpKK223-4(特願昭60-242528)のlacプロモーター、rrnBリボリームRNAターミネーター、発現ベクターpDR720(ファルマシア社)のtrpプロモーターあるいは誘導可能な発現ベクターpPLlambda(ファルマシア社)のPLプロモータ

ーなどを用いることができる。

本発明の2種殺虫蛋白の同時発現プラスミドを、例えば大腸菌 JM109株(ファルマシア社)等の宿主微生物へ導入することにより菌体内で2種の殺虫蛋白を同時発現する微生物を得ることができる。

この様にして製造された形質転換微生物を、適当な培地、条件で培養することにより、2種の殺虫蛋白を同時生産することが可能である。培養後の殺虫蛋白の単離は、例えば固体を超音波で破碎し、遠心分離を行って、該殺虫蛋白の凝聚体を容易に濃縮、回収することにより行うことができる。

また、大腸菌の宿主-ベクター系のみならず、枯草菌、酵母、シュードモナス菌、あるいは放線菌等の宿主-ベクター系も利用可能であり、それぞれの宿主-ベクター系の特徴を生かした殺虫蛋白の大量生産が行える。

以下に実施例を挙げ本発明を詳細に説明する。本発明は、以下の実施例のみに限定されるものではなく、本発明の技術分野における通常の変更をすることができる。

$MgCl_2$ 、1 mM 2-メルカブトエタノール、50 μ M dATP、50 μ M dCTP、50 μ M dGTP、50 μ M TTP] 中37°Cで60分間反応した。反応後、常法に従い、クロロホルム-フェノール処理、エタノール沈澱を行いDNAを回収し、10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。得られたDNA溶液5 μ lに、Bam HIリソルブ(宝酒造)1 μ lを加え、DNAライゲーションキット(宝酒造)A液40 μ l及び同B液を加えて摺拌し、16°C 1時間反応した。その後、Cohenらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110-2114)に従い、反応液を大腸菌 JM103株(ファルマシア社)に形質転換した。出現したアンピリシン耐性のコロニーを培養し、Birnboimらの方法(Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523)に従いプラスミドDNAを調製した。約1 μ gのプラスミドDNAに、3ユニットの制限酵素Bam HIを加え、20 μ lのHI反応液(前述)中で37°C、1時間反応し、アガロースゲル電気泳動で分析した。約2.4kb及び3.8kbの2本のBam HI断片を持つプラスミドを選択し、これをpAH11とした。(第4図)

実施例1.

1. 2種の殺虫蛋白の同時発現用プラスミド pKC B1の構築

ステップ1: プラスミド pAH11の構築

約5 μ gの130KDaの殺虫蛋白遺伝子発現用プラスミドpAH8(特開昭62-181784)に20ユニットの制限酵素Nde Iを加え、200 μ lのHigh反応液(50 mMトリス・塩酸(pH7.5)、100 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1 mMジチオスレイトール)中で37°C 1時間反応後、反応液に等量のクロロホルム・フェノール(1:1)混液を加え、混合し、10,000 rpmで5分間遠心した。上層を分取した後、1/50容の5 M NaCl及び2容のエタノールを加えて-80°Cに15分間放置することによりDNAをエタノール沈澱した後、10,000 rpmで10分間遠心してDNAを回収し、10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。以下、反応後のDNAの回収は上述の方法に従い、実施した。得られたDNA溶液5 μ lに10ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼ・クレノー断片を加え、20 μ lのポリメラーゼ反応液(50 mMリソリブン酸カルシウム、5 mM

ステップ2: 2種の殺虫蛋白の同時発現用プラスミドpKC B1の構築

135KDa殺虫蛋白遺伝子の発現用プラスミドpKC6(特開昭61-193483にかかる寄託微生物 E.coli JM103/pKC6(ATCC 67487)から得られる)の約5 μ gに対し、20ユニットの制限酵素Bam HIを加え、200 μ lのHigh反応液中で37°C、1時間反応し、常法に従いDNAを回収し、10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。10 μ lのDNA溶液に5ユニットのアルカリホスファターゼ(宝酒造)を加え、ホスファターゼ反応液中で60°C 1時間反応後、常法のフェノール-クロロホルム処理を2回行った後、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。つぎに、約5 μ gのプラスミドpAH11に制限酵素Bam HIを加え、200 μ l Highの反応液中で37°C、1時間反応後、反応後を常法に従い臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。常法に従い、紫外線ランプ下で、3.8kbのDNA断片に相当するバンドを切り出し、ゲルを融解した。さらに

フェノール処理を行い、DNAをエタノール沈澱により回収し、10 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製した約1 μ gのBam-HI切断済みのプラスミドpKC6と約1 μ gの3.8kbのBam-HIDNA断片を混合し、全容10 μ lとし、DNAライゲーションキット(宝酒造)A液40 μ l及び同B液5 μ lを加えて攪拌し、16°Cで1時間反応した。その後、反応液5 μ lを大腸菌JM109株コンピーテントセル(宝酒造)100 μ lと混合後、0°C30分放置した後42°Cで2分間熱処理した。この溶液に900 μ lのレブロス培地(1 lの蒸留水に対し、10gのトリプトソ(ディフコ社)、5gのイーストエキストラクト(ディフコ社)、5gのNaClを含む培地)を加え、37°C1時間インキュベート後、50 μ g/mlのアンピシリンを含むレブロス寒天培地(レブロス液体培地1 lに対して12gの寒天を含む。)にプレートした。出現したアンピシリン耐性のコロニーを培養し、Birnboimらの方法に従いプラスミドDNAを調製した。約1 μ gのプラスミドDNAに3ユニットの制限酵素Bam-HIを加え、20

μ lのHigh反応液中で37°C、1時間反応し、アガロースゲル電気泳動で分析した。インサートDNAとして3.8kbのBam-HI断片を持つプラスミドを選択し、これをpKCB1とした。(第4図)

II. 大腸菌での殺虫蛋白の生産

構築した発現プラスミドpKCB1をCohenらの方法に従い、大腸菌JM109株へ導入した。得られた大腸菌組換え体JM109/pKCB1が生産するバチラス・チュリンゲンシス・アイザワイIPL株の殺虫蛋白の同定・分析を以下の如く行った。大腸菌JM109/pKCB1株を最終濃度50 μ g/mlのアンピシリンを含むレブロス液体培地中で一夜培養する。0.3 mlの終夜培養液を分取し、遠心操作(10,000rpm、2分間)により集菌し、100 μ lのサンプル緩衝液(62.5 mMトリス-塩酸(pH8.8)、2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、5% (v/v) 2-メルカプトエタノール、10% (v/v) グリセノール、0.01% (w/v) ブロムフェノールブルー)に懸濁後、100°Cで5分間熱処理した。10,000rpmで5分間遠心し上清を分取した後、その20 μ lをLaemmli

らの方法(Nature 227, 680-685)に従ってSDS-Pアクリルアミド電気泳動にかけた。泳動後、ゲルをクマジーブリリアントブルーで染色し、脱気乾燥してろ紙に固定した。その結果、発現プラスミドpKCB1を含む大腸菌JM109株では、分子量130kDaと135kDaの2種の殺虫蛋白バンドが検出された。ゲル上の両蛋白バンドをデンシトメーターで測定したところ、大腸菌JM109/pKCB1株はそれそれ全菌体蛋白あたり5%の130kDaおよび3.5%の135kDa殺虫蛋白を同時生産していた。従って、大腸菌組換え体JM109/pKCB1は、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイIPL株の2種の殺虫蛋白である130kDaおよび135kDa殺虫蛋白を効率よく同時生産していることが明らかとなった。

III. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の調製法

大腸菌組換え体JM109/pKCB1株を、レブロス液体培地中で一夜培養した後、その0.1mlを10mlのレブロス培地に移し、37°Cで20時間培養した。培養液5mlを分取し、6,000rpm、5分間遠心して菌を集め、-80°Cで凍結させた後、室温で融解させ

た。この操作を3回くり返した後、2mlのTE緩衝液(10mmol Tris-HCl (pH 7.5)/1mmol EDTA)に懸濁し30秒づつ5回の超音波処理を行った。つぎに、この粗抽出液を7,000rpmで5分間遠心し沈澱を集めた。調製した沈澱蛋白をSDS-Pアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、含まれる全蛋白の少なくとも85%が殺虫蛋白であった。従って、上記調製法を用いることにより、容易に効率良く殺虫蛋白を調製できることが明らかとなった。なお、この調製法は、大量の培養液についても有効であることを確認している。1l培養液あたり約270mgの殺虫蛋白が生産された。130kDaと135kDa蛋白の量比はほぼ1:1であった。

IV. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の殺虫活性

IIIに記載した方法で、大腸菌組換え体JM109/pKCB1株からBT殺虫蛋白を調製した。10gの鱗翅目幼虫用人工飼料を準備し、これに調製した殺虫蛋白懸濁液を加えた。処理した後、風乾し、ハスモンヨトウ(*Spodoptera littoralis*)あるいはカイコ(*Bombyx mori*)の4令幼虫をそれぞれ10匹放

飼した。放倒後、頃食3日間行わせた後、死亡した幼虫数を調査した。対照としては、大腸菌組換え体JM109/pTBI(特開昭62-181784)および大腸菌組換え体JM109/pKCG(ATCC 67487)からそれぞれ調製した130kDa殺虫蛋白および135kDa殺虫蛋白を用いた。カイコに対し各種殺虫蛋白10μgを人工飼料に処理した場合、135kDa殺虫蛋白および130kDa殺虫蛋白では、各々10匹中10匹および10匹中1匹の死亡が認められた。このとき、JM109/pKCB1株由来の130kDa、135kDa混合殺虫蛋白では、10匹中6匹の死亡が認められた。一方、分類学上、カイコと異なるハスモンヨトウに対し、各種殺虫蛋白200μgを人工飼料に処理した場合、130kDa殺虫蛋白および135kDa殺虫蛋白では、各々10匹中10匹および10匹中1匹の死亡が認められた。このとき、JM109/pKCB1株由来の130kDa、135kDa混合殺虫蛋白では、10匹中7匹の死亡が認められた。従って、本発明の大腸菌組換え体JM109/pKCB1株のつくる殺虫蛋白は、上記の両昆虫に対し有効な殺虫蛋白であることが判明した。

dTTP) 中37°Cで60分間反応した。反応後、常法に従い、クロロホルム・フェノール処理、エタノール沈澱を行いDNAを回収し、10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。得られたDNA溶液5μlに、S₁lelリンカー(宝酒造)1μlを加え、DNAライゲーションキット(宝酒造)A液40μl及び同B液5μlを加えて攪拌し、16°C、1時間反応した。その後、Cohenらの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110-2114)に従い、反応液を大腸菌JM109株(ファルマシア社)に形質転換した。出現したアンピシリン耐性のコロニーをしプロス培地にて培養し、Birnboimらの方法(Nucleic Acids Res.) 7, 1513-1523)に従い、プラスミドDNAを調製した。約1μgのプラスミドDNAに、3ユニットの制限酵素S₁lelを加え、20μlのHigh反応液(前述)中で37°C、1時間反応し、アガロースゲル電気泳動で分析した。約1.6kbおよび6.6kbの2本のS₁lel断片を持つプラスミドを選択し、これをpTBI-12とした。さらにpTBI-12のS₁lel切断混液5μlにDN

実施例2

I. 2種の殺虫蛋白の同時発現用プラスミドpTBKCSの構築

ステップ1: プラスミドpTBISの構築

約5μgの130kDaの殺虫蛋白遺伝子発現用プラスミドpTBI(特開昭62-181784に従い、パチラス・チューリングンシス・アイザワイ IPL No.7株(PEMBR BP-1150)より構築できる)に20ユニットの制限酵素N_delを加え、200μlのHigh反応液(50mMトリス、塩酸(pH 7.5)、100mM NaCl、10mM MgCl₂、1mMジチオスレイトール)中で37°C 1時間反応後、反応液に等量のクロロホルム・フェノール(1:1)混液を加え、混合し、10,000rpmで5分間遠心した。実施例1のI-ステップ1に従いDNAを回収し、10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。得られたDNA溶液5μlに10ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼ・クレノー断片を加え、20μlのポリメラーゼ反応液(50mMリシン酸カルシウム、5mM MgCl₂、1mM 2-メルカプトエタノール、50μM dATP、50μM dGTP、50μM

AライゲーションキットA液40μl、B液μlを加え、37°Cで1時間反応し、大腸菌JM109株に形質転換した。得られたコロニーから前述のようにプラスミドDNAを調製し、6.6kbのS₁lel断片のみを生じるクローンを選択し、そのプラスミドをpTBISとした。

ステップ2: 135kDa蛋白遺伝子を含む5kb S₁lelカートリッジの作製

約5μgの135kDaの殺虫蛋白遺伝子発現用プラスミドpKCG(ATCC 67487)に10ユニットの制限酵素N_rul(バイオ・ラボ社)を加え、200μlのN_rul反応液(50mMトリト・塩酸(pH 7.5)、50mM NaCl、50mM KCl、10mM MgCl₂)中で37°C 1時間反応後、常法に従い臭化エチジウムを含む0.8%のアガロース電気泳動により、DNAが1ヶ所切断が行われていることを確認した。引きつづき、フェノール処理及びエタノール沈澱を行ない、DNAを回収し10μlの滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製したDNA溶液5μlに5μlの制限酵素S_calを加え、100μl

のScaI 反応液 (10mM Tris-HCl (pH 8.0)、20mM KCl、7mM MgCl₂、7mM 2-MeOH) 中で37°C 1 時間反応後、常法に従いフェノール抽出、エタノール沈澱を行い、DNAを回収し、10 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。

一方、5 μg のクローニングベクター pUC18 (ファルマシア社) に対し、5 ユニットの制限酵素SmaI (宝酒造) を加え、SmaI 反応液 (10mM トリス・塩酸 (pH 7.5)、20mM KCl 7mM MgCl₂、7mM 2-MeOH) 中で30°C、1 時間反応し、常法に従いDNAを回収し、10 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。10 μl のDNA溶液に5 ユニットのアルカリホスファターゼ (宝酒造) を加え、ホスファターゼ反応液 (10mM トリス・塩酸 (pH 8.0)、100mM KCl、1M MgSO₄) 中で65°C 1 時間反応後、常法のフェノール・クロロホルム処理を2回行った後、エノール沈澱を行い、DNAを回収し、10 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製した約1 μg のSCaI 切断済みのプラスミド pUC18と先に調製した約1 μg の5.0 Kb

のSmaI - NruI DNA断片を混合し、全容10 μl とし、DNAライゲーションキット (宝酒造) A液40 μl 及び B液5 μl を加えて攪拌し、16°Cで1 時間反応した。その後、反応液5 μl を大腸菌JM 109株コンビーテントセル (宝酒造) 100 μl と混合し、形質転換を行った。形質転換体を最終濃度2 mMのイソプロピル-β-D-ガラクトシド (IPTG) 0.05mMx-gal、および50 μg/ml のアンビシリソを含むレブロス平板培地 (1 l の蒸留水に対し、10 g のトリアトン (ディフコ社)、5 g のNaCl (半井化学)、5 g のイーストエキストラクト (ディフコ社) を加え、さらに12 g の寒天を加え固化した培地) にプレートした。出現したアンビシリソ耐性の白色コロニーを培養し、プラスミドDNAを調製した。約1 μg のプラスミドDNAに3 ユニットの制限酵素SalI を加え、20 μl のBglII反応液中で37°C、1 時間反応し、アガロース電気泳動で分析した。インサートDNAとして5.0 KbのSalI 断片をもつプラスミドを選択し、これを pKU58とした。10 μ

g のプラスミド pKU58に対し10 ユニットの制限酵素SalI を加えて、37°C 1 時間反応後、反応液を臭化エチジウムを含む0.8%の低融点アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。常法に従い、紫外線ランプ下で5.0 KbのDNA断片に相当するバンドを切り出し、ゲルを融解した。さらにフェノール処理を行い、DNAをエタノール沈澱により回収し、10 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。

ステップ3: 発現プラスミドpTBKCSの構築

約5 μg のプラスミド pTBKCSに10 ユニットの制限酵素SalI を加え、100 μl のBglII反応液中で、37°C 1 時間反応後、常法に従い、クロロホルム・フェノール処理およびエタノール沈澱を行いDNAを回収10 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。得られた10 μl のDNA溶液に5 ユニットのアルカリホスファターゼ (宝酒造) を加え、ホスファターゼ反応液 (前述) 中で37°C 1 時間反応後、常法のフェノール・クロロホルム処理を2回行った後、エタノール沈澱し、DNAを回収し、10 μl の滅菌蒸留水に懸濁した。このようにして調製したS

alI 切断済みDNAの5 μl に対し、ステップ2で調製した5 Kb SalI カートリッジ5 μl を加え、常法に従いリガーゼ反応を行った。この反応液を大腸菌JM 109株に形質転換し、アンビシリソ耐性コロニーを選択した。常法に従いプラスミドDNAを調製後、制限酵素SalI 切断を行い、6.6 Kbおよび5.0 Kbの断片を生じるコロニーを選択し、さらに制限酵素BamH I の切断により6.6 Kb、5.0 Kbの断片を生じるクローンpTBKCSを得た。このプラスミドは、tacプロモーターとrrnBターミネーターを含む130kDa蛋白遺伝子カートリッジと tacプロモーターとrrnBターミネーターを含む、135kDa蛋白遺伝子カートリッジが正方向に並んでいるクローンであることが確認された。

II. 大腸菌での殺虫蛋白の生産

得られた大腸菌組換え体JM 109/pTBKCSが生産するパチラス・チュリンゲンシス・アイザワイIPSL株の殺虫蛋白の同定・分析を実施例1のIIに従い行った。その結果、発現プラスミドpTBKCSを含む大腸菌JM 109株では、分子量130kDaと135kDa

の2種の殺虫蛋白バンドが検出された。ゲル上の両蛋白バンドをデンシトメーターで測定したところ、大腸菌JM 109/pTBKCS株はそれぞれ全菌体蛋白あたり12%の130kDaおよび12%の135kDa殺虫蛋白を同時生産していた。従って、大腸菌組換え体JM 109/pTBKCSは、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の2種の殺虫蛋白である130kDaおよび135kDa殺虫蛋白を効率よく同時生産していることが明らかとなった。

III. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の調製法

大腸菌組換え体JM 109/pTBKCS株から実施例1のⅢに従い殺虫蛋白を調整した。調製した沈殿部分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、含まれる全蛋白の少なくとも90%が殺虫蛋白であった。1ℓの培養液あたり約380mgの殺虫蛋白が生産された。130kDaと135kDaの蛋白の量比は1:1であった。

IV. 大腸菌で生産された殺虫蛋白の殺虫活性

Ⅲに記載した方法で、大腸菌組換え体JM 109/pTBKCS株からBT殺虫蛋白を調製した。10gの鱗翅

目幼虫用人工飼料を準備し、これにⅢで調製した殺虫蛋白懸濁液を以下の割合で加えた。処理した後、風乾し、ハスモンヨトウ(*Spodopteralitura*)あるいはカイコ(*Bombyx mori*)の4令幼虫をそれぞれ6匹放飼した。放飼後、ハスモンヨトウについては6日間、カイコについては3日間摂食させた後、死亡した幼虫数を調査した。対照としては、大腸菌組換え体JM 109/pTBI(特開昭62-181784)および大腸菌組換え体JM 109/pKCG(ATCC 67487)からそれぞれ調製した130kDa殺虫蛋白および135kDa殺虫蛋白を用いた。カイコに対し各種殺虫蛋白50μgを人工飼料に処理した場合、135kDa殺虫蛋白および130kDa殺虫蛋白では、各々10匹中8匹および10匹中2匹の死亡が認められた。このとき、JM 109/pTBKCS株由来の130kDa、135kDa混合殺虫蛋白では、10匹中4匹の死亡が認められた。一方、分類学上、カイコと異なるハスモンヨトウに対し、各種殺虫蛋白540μgを人工飼料に処理した場合、130kDa殺虫蛋白および135kDa殺虫蛋白では、各々6匹中2匹

および6匹中0匹の死亡が認められた。なお、前者ではさらに成育不良固体が2匹認められた。このとき、JM 109/pTBKCS株由来の130kDa、135kDa混合蛋白では、6匹中2匹の死亡が認められた。このときの飼料植物の食害の程度は、130kDa殺虫蛋白、130kDaおよび135kDa混合殺虫蛋白、135kDa殺虫蛋白の順に大きかった。従って、本発明の大腸菌組換え体JM 109/pTBKCS株のつくる殺虫蛋白は、上記の両昆虫に対し十分に有効な殺虫蛋白であることが判明した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株のプラスミドDNAからクローニングした130kDa殺虫蛋白構造遺伝子の塩基配列および塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示している。

第2図は、バチラス・チュリンゲンシス・アイザワイ IPL株の染色体DNAからクローニングした135kDa殺虫蛋白構造遺伝子の塩基配列および塩基配列から推定されたアミノ酸配列を示している。

第3図は、プラスミドpKCB1の130kDa殺虫

蛋白遺伝子および135kDa殺虫蛋白遺伝子の接続部位を示している。塩基配列およびボックスの下は各遺伝子の由来部位を示している。塩基配列およびボックスの上の矢印は制限酵素部位を、-35および-10は各々135kDa殺虫蛋白遺伝子の大腸菌プロモーター・コンセンサス-35領域、-10領域を、SDはShine-Dalgarno配列を示している。

Bm: Bam H I, Ps: Pat I,

Bm/Bm: Bam H IとBam H Iの結合部位

Bc/Ab: Hinc IIとAba III部位の結合部位

EV223-4: 発現ベクターpKK223-4

V18L: ベクターpUC18のリンカー部分

130kDa(5'): 130kDa殺虫蛋白遺伝子の5'末端部分

130kDa: 130kDa殺虫蛋白構造遺伝子

130kDa(3'): 130kDa殺虫蛋白遺伝子の3'末端部分

10 塩基

130kDa(3')と135kDa(5')の間に位置するV18L:

ベクターpUC18のリンカー部分24塩基とそれに続く210塩基

135kDa(5'): 135kDa殺虫蛋白遺伝子の5'末端部分

135kDa;135kDa 殺虫蛋白構造遺伝子

135kDa(3') ;135kDa 殺虫蛋白遺伝子の3'末端部分
tac : tacプロモーター。

rrnB terminator:リボソーム RNA遺伝子のターミネーター

黒色部分、白色部分はそれぞれ殺虫蛋白構造遺伝子およびその3'末端、5'末端部分を示す。

第4図は、130kDaの殺虫蛋白遺伝子をBamH Iカートリッジとして保有するプラスミドpAH11の構造および130kDa,135kDa の殺虫蛋白遺伝子を同時に発現するためのプラスミドpKCB1の構造を示している。

pol I : DNA ポリメラーゼ I, Nd : Nde I, Bm : Bam H I, Kp : Kpn I, Pv : Pvu II, Ps : Pst I, tac : tacプロモーター, rrnB (T) : リボソーム RNA遺伝子のターミネーターを各々示す。

白色部分、黒色部、およびドット部分はそれぞれ tacプロモーター、殺虫蛋白遺伝子部分およびリボソーム RNA遺伝子ターミネーターを示している。

第5図は、大腸菌JM109/pKCB1株で同時に生産され

た130kDaおよび135kDa殺虫蛋白の SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンのデンシトメータースキャンを示している。

第6図は、130kDa、135kDaの殺虫蛋白遺伝子を同時に発現するためのプラスミドpTBK5の構造を示している。

pol I : DNA ポリメラーゼ I,

Bm : Bam H I, Kp : Kpn I,

Nd : Nde I, Nr : Nru I,

Sa : Sal I, Sc : Scal I,

Sm : Sma I,

Nr / Sm : Nru I と Sma I の結合部位

Sc / Sm : Scal I と Sma I の結合部位
白色部分、黒色部分、およびドット部分は各々、 tacプロモーター、殺虫蛋白遺伝子、およびリボソーム RNA遺伝子ターミネーターを示している。

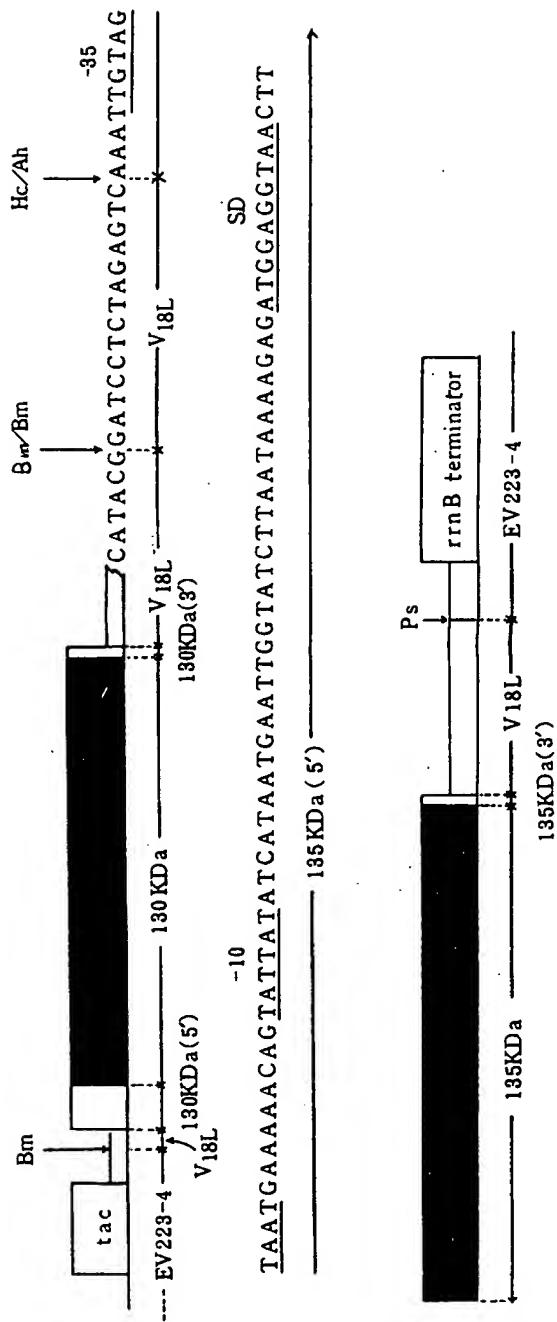
第7図は、大腸菌JM109/pTBK5株で同時に生産された130kDaおよび135kDa殺虫蛋白の SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンのデンシトメータースキャンを示している。

第1回(その2)

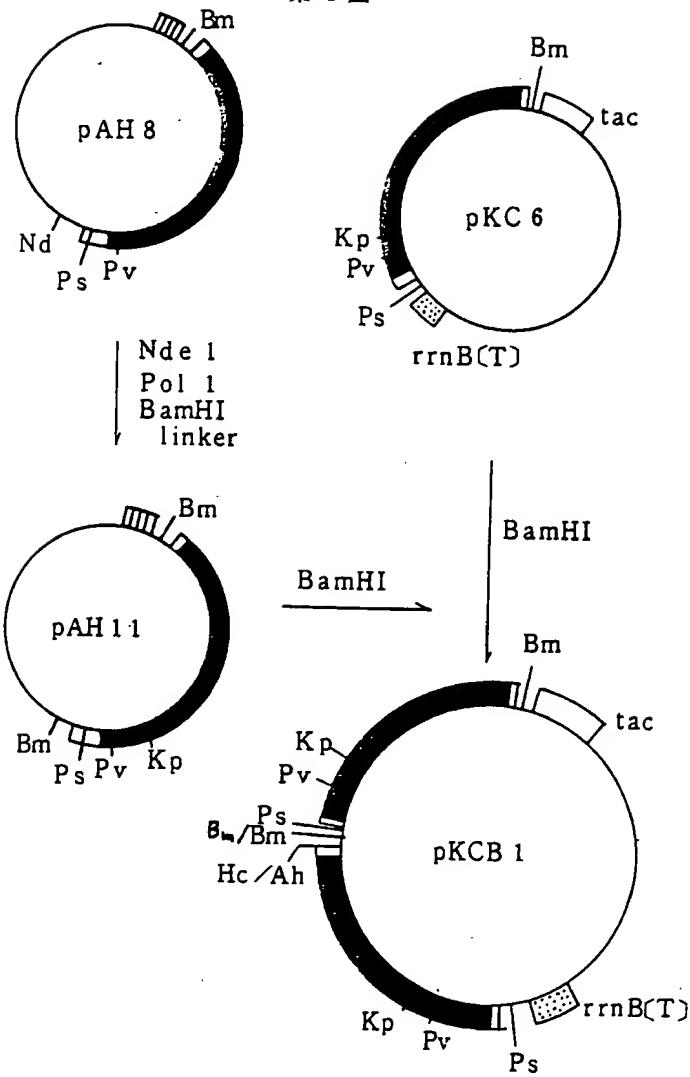
第1圖(その3)

図2(その3)

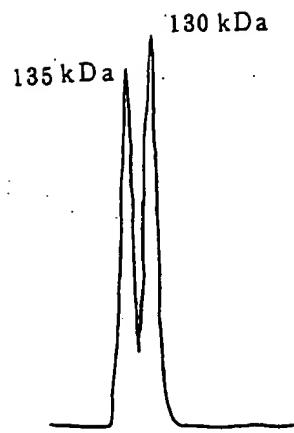
四三



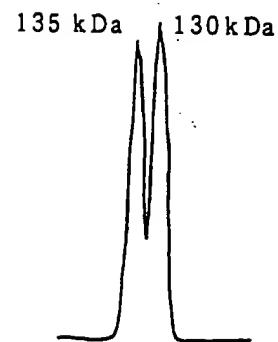
第4図



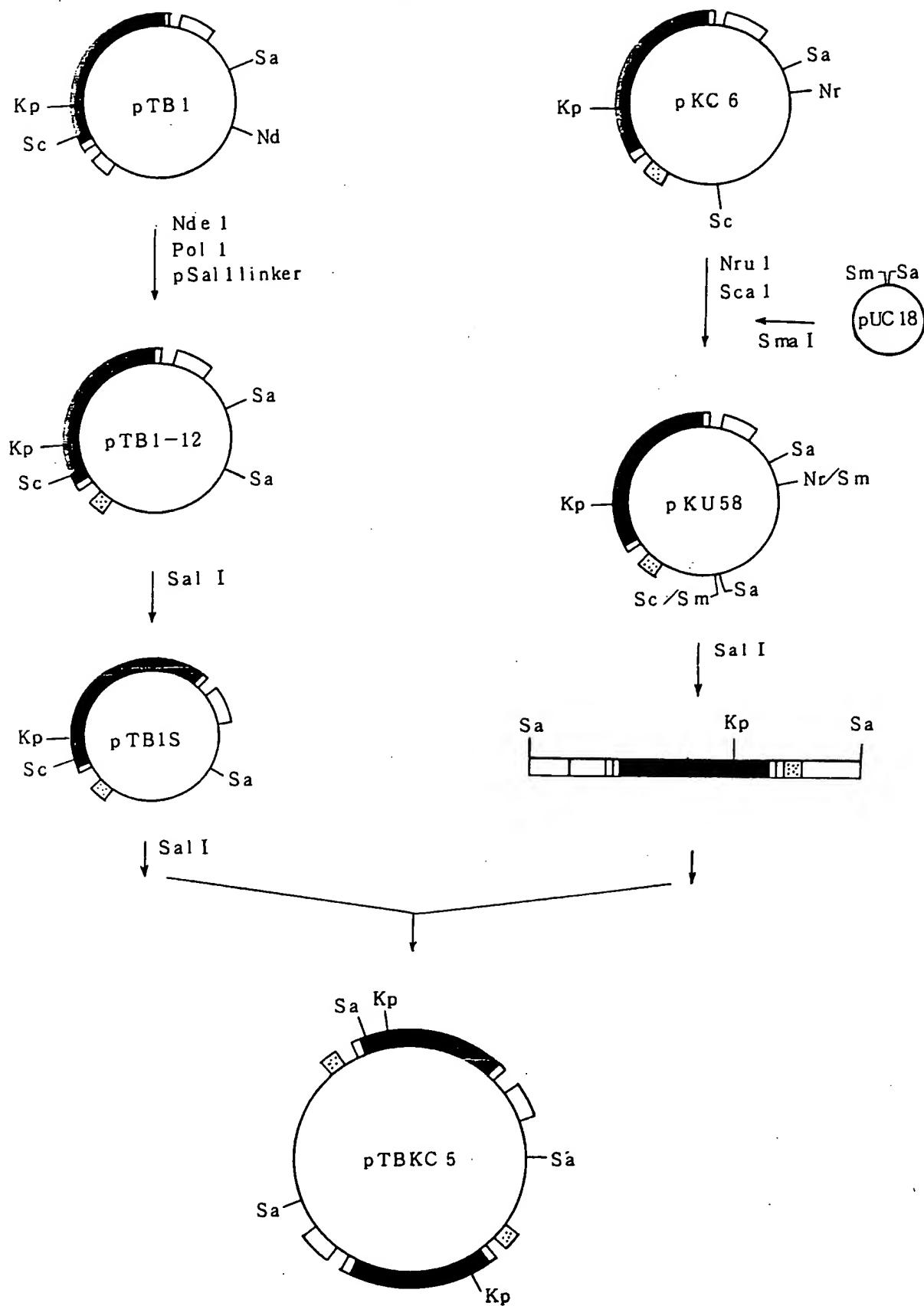
第 5 図



第 7 図



第 6 図



第1頁の続き

⑤Int.Cl.*

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 15/00
C 12 R 1:07)
(C 12 N 1/20
C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)

⑦発明者 清水 将年 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内
⑦発明者 中村 啓子 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内
⑦発明者 高田 容司 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内
⑦発明者 三木谷 研一 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内
⑦発明者 大川 秀郎 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
内